

Producción de jarabes fermentables a partir de la mazorca de cacao CCN51 y producción de etanol de segunda generación por la acción de *Kluyveromyces marxianus*.

Katerin Liliana Nuñez Piñerez

Trabajo de Grado para Optar el Título de Química

Director

Daniel Ricardo Molina Velasco

Doctor en Química

Co-Directora

Yarileny Castellanos Villamizar

Magíster en Microbiología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2020

### **Agradecimientos**

A Dios y a la Virgen de Guadalupe, por ser guía y soporte en el camino; por darme siempre la sabiduría y la paciencia para poder cumplir con los objetivos propuestos. A mis padres, por ser el mejor ejemplo de honestidad y perseverancia, por estar siempre a mi lado y brindarme todo su amor; a mi hermano, por ser luz en mi camino. Al presbítero Mauricio Rincón Stella, por todo el apoyo y sus sabios consejos.

Al profesor Daniel Molina, por su apoyo, enseñanzas y correcciones durante la realización del proyecto y por su confianza en mí para llevarlo a cabo. A Yarileny, por ser una mano amiga y apoyo incondicional durante todo este proceso.

A mis amigas, Laura y Kelly, que estuvieron siempre a lo largo del camino, dándome su mano y su cariño. A Julio, por su apoyo incondicional, su voz de aliento y su cariño sincero. A mis compañeros del laboratorio 404 del Parque Tecnológico Guatiguará, Eli, Dani, David, Lucia y Mauricio, por todos sus consejos y orientación.

Al Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM), por el financiamiento de este proyecto a través del Proyecto de Investigación Aprovechamiento integral y valorización de los sub-productos provenientes del cacao *Theobroma cacao* para la obtención de productos biotecnológicos innovadores, del Sistema Nacional de Regalías.

A todos los docentes de la Escuela de Química que hicieron parte de mi formación profesional, sin su orientación este sueño no sería posible. Por último, a la Universidad Industrial de Santander, por la formación profesional y humana brindada y por permitirme vivir la mejor experiencia de mi vida en ella.

**Tabla de contenido**

<b>Introducción</b>	<b>10</b>
<b>1 Objetivos</b>	<b>13</b>
1.1 Objetivo general .....	13
1.2 Objetivos específicos .....	13
<b>2 Marco teórico</b>	<b>13</b>
2.1 El cacao .....	13
2.2 Producción de jarabes fermentables .....	14
2.2.1 <i>Pretratamiento</i> .....	15
2.2.2 <i>Hidrólisis</i> .....	17
2.2.3 <i>Desintoxicación e hidrólisis simultáneas</i> .....	18
2.3 Caracterización de jarabes fermentables .....	19
2.3.1 <i>Cuantificación por espectrofotometría UV-Vis</i> .....	19
2.3.2 <i>Caracterización por RMN <sup>1</sup>H</i> .....	19
2.4 Fermentación .....	20
<b>3 Parte experimental</b>	<b>22</b>
3.1 Materia Prima .....	22
3.2 Obtención de jarabes fermentables .....	22
3.2.1 <i>Pretratamiento e hidrólisis enzimática simultaneas</i> .....	22
3.2.2 <i>Determinación de la actividad enzimática</i> .....	23
3.3 Cuantificación y caracterización de los jarabes fermentables .....	25

PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN	4
3.3.1 <i>Cuantificación de azúcares reductores totales</i>	25
3.3.2 <i>Cuantificación de glucosa</i>	25
3.3.3 <i>Cuantificación de compuestos fenólicos</i>	26
3.3.4 <i>Caracterización con RMN <sup>1</sup>H</i>	26
3.4 Producción de etanol	27
3.4.1 <i>Cepa e inóculo</i>	27
3.4.2 <i>Fermentación con Kluyveromyces marxianus</i>	28
3.4.3 <i>Cuantificación de etanol</i>	28
<b>4 Resultados y discusión</b>	<b>29</b>
4.1 Tamizado de la mazorca de cacao CCN-51	29
4.2 Pretratamiento e hidrólisis	30
4.3 Caracterización por RMN <sup>1</sup> H	32
4.3.1 <i>Análisis cualitativo</i>	32
4.3.2 <i>Análisis cuantitativo</i>	34
4.4 Fermentación	35
<b>5 Conclusiones</b>	<b>39</b>
<b>6 Recomendaciones</b>	<b>40</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>41</b>
<b>Apéndice</b>	<b>49</b>

**Lista de tablas**

Tabla	1. <i>Composición de la biomasa lignocelulósica de la mazorca del Cacao CCN-51, adaptado de Carpio y cols., s.f.</i> .....	14
Tabla	2. <i>Porcentaje del peso de cada tamaño de partícula sobre el peso total.</i> .....	29
Tabla	3. <i>Asignación de las señales identificables del espectro RMN <sup>1</sup>H para el jarabe fermentable obtenido de la cáscara de mazorca de cacao retenida en la malla 40.</i>	33
Tabla	4. <i>Concentración de glucosa en 15 mg de jarabe fermentable liofilizado</i> .....	35

**Lista de figuras**

Figura	1. <i>Estructura de la lignina y sus componentes; a, alcohol sinapílico; b, alcohol coniferílico; c, alcohol cumarílico. Adaptado de Chávez-Sifontes y Domines., 2013. ....</i>	17
Figura	2. <i>Representación de la hidrólisis enzimática de la celulosa. Adaptado de Peralta y cols., 2017. ....</i>	18
Figura	3. <i>Fermentación alcohólica. Adaptado de Maicas, 2020. ....</i>	20
Figura	4. <i>Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con un azúcar reductor. Adaptado de Tena y Jorrin, 2010. ....</i>	24
Figura	5. <i>Transformación del ABTS por acción de las Lacasas. Adaptado de Kadnikova y Kostickostic, 2002. ....</i>	25
Figura	6. <i>Oxidación del etanol por acción del dicromato de potasio en medio ácido.. Adaptado de Sáez-Plaza, Martin, y Asuero, 2017. ....</i>	29
Figura	7. <i>Concentración normalizada de glucosa (<math>g \cdot L^{-1}</math>) de los ocho jarabes fermentables.</i>	30
Figura	8. <i>Concentración normalizada de azúcares reductores (<math>g \cdot L^{-1}</math>) de los ocho jarabes fermentables. ....</i>	31
Figura	9. <i>Comparación de la concentración de compuestos fenólicos (<math>g \cdot L^{-1}</math>) de los ocho jarabes fermentables con sus respectivos blancos. ....</i>	31
Figura	10. <i>Espectro de RMN <math>^1H</math> para el jarabe fermentable obtenido de la cáscara de mazorca de cacao retenida en la malla 40. ....</i>	33
Figura	11. <i>Consumo de glucosa (<math>g \cdot L^{-1}</math>) y consumo azúcares reductores (<math>g \cdot L^{-1}</math>) y producción de etanol (<math>g \cdot L^{-1}</math>) en el proceso de fermentación a escala de laboratorio bajo condiciones óptimas de temperatura y agitación, en jarabe fermentable ...</i>	36

Figura 12. *Consumo de glucosa ( $g \cdot L^{-1}$ ) y consumo azúcares reductores ( $g \cdot L^{-1}$ ) y producción de etanol ( $g \cdot L^{-1}$ ) en el proceso de fermentación a escala de laboratorio bajo condiciones óptimas de temperatura y agitación, en medio cezapek . . . . .* 37

Figura 13. *Comparación de la biomasa de *Kluyveromyces marxianus* ( $cel \cdot mL^{-1}$ ) obtenida en los dos medios de fermentación evaluados, correspondientes a jarabes fermentables y medio cezapek . . . . .* 38

**RESUMEN**

**TÍTULO:** Producción de jarabes fermentables a partir de la mazorca de cacao CCN51 y producción de etanol de segunda generación por la acción de *Kluyveromyces marxianus*.\*

**AUTOR:** Nuñez Piñerez, Katerin Liliana\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Bioetanol, jarabe fermentable, cacao CCN-51, enzimas, *Kluyveromyces marxianus*.

**DESCRIPCIÓN:** En este trabajo de investigación se obtuvo etanol de segunda generación, a partir de jarabes fermentables obtenidos mediante la hidrólisis de la mazorca de cacao CCN51 previamente triturada y tamizada en ocho tamaños de partícula diferente y posterior fermentación con *Kluyveromyces marxianus*. Los procesos de pretratamiento e hidrólisis se realizaron de forma simultánea, empleando enzimas lacasas para la desintoxicación por compuestos fenólicos, inhibidores de la fermentación, derivados de la lignina y celulasas para la hidrólisis de los enlaces  $\beta$  (1 - 4) de la celulosa para liberar glucosa y otros azúcares reductores; los jarabes fermentables obtenidos se caracterizaron cuantificando glucosa, azúcares reductores y compuestos fenólicos por espectrofotometría UV-Vis, y a partir de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se identificaron algunos compuestos químicos presentes en estos. El jarabe fermentable obtenido del tamaño de partícula retenido en la malla 40 Mesh (0,425 mm), fue el que obtuvo la mejor relación glucosa – compuestos fenólicos, por ello fue seleccionado para el proceso de fermentación. El proceso de fermentación se llevó a cabo empleando la cepa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* DMS 5418 y con condiciones óptimas de 36°C y 55 rpm, obteniendo una concentración de 4,8252 g\*L<sup>-1</sup> de etanol después de seis horas.

---

\* Proyecto de investigación

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director Ph.D. Daniel Ricardo Molina Velasco. Codirectora M.Sc. Yarileny Castellanos Villamizar

**ABSTRACT**

**TITLE:** Production of fermentable syrups from the CCN51 cocoa pod and production of second generation ethanol by the action of *Kluyveromyces marxianus*.\*

**AUTHOR:** Nuñez Piñerez, Katerin Liliana\*\*

**KEYWORDS:** Bioethanol, fermentable syrup, CCN-51 cocoa, enzymes, *Kluyveromyces marxianus*.

**DESCRIPTION:** In this research work, second generation ethanol was obtained from fermentable syrups obtained by hydrolysis of the CCN51 cocoa pod previously crushed and sieved into eight different particle sizes and subsequent fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. The pretreatment and hydrolysis processes were carried out simultaneously, using laccase enzymes for detoxification by phenolic compounds, fermentation inhibitors, lignin derivatives and cellulases for the hydrolysis of the  $\beta$  (1 - 4) bonds of cellulose to release glucose and other reducing sugars; The fermentable syrups obtained were characterized by quantifying glucose, reducing sugars and phenolic compounds by UV-Vis spectrophotometry, and some chemical compounds present in them were identified from the  $^1\text{H}$  NMR spectra. The fermentable syrup obtained from the particle size retained in the 40 Mesh (0.425 mm), was the one that obtained the best glucose-phenolic compounds ratio, therefore it was selected for the fermentation process. The fermentation process was carried out using the yeast strain *Kluyveromyces marxianus* DMS 5418 and with optimal conditions of 36°C and 55 rpm, obtaining a concentration of 4.8252 g\*L<sup>-1</sup> of ethanol after six hours of fermentation.

---

\* Investigation Project.

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Advisors: Ph.D. Daniel Ricardo Molina Velasco. M.Sc. Yarileny Castellanos Villamizar.

## Introducción

La contaminación ambiental es uno de los problemas más preocupantes de la sociedad en la actualidad; ciudades como Bogotá, Medellín y Bucaramanga presentan niveles elevados de contaminación por las emisiones de material particulado, SO<sub>x</sub>, CO<sub>x</sub> y NO<sub>x</sub>, que desencadenan en problemas respiratorios que disminuyen la calidad de vida de las personas (Segura-Contreras y Franco, 2016). En Bucaramanga y su área metropolitana, la entidad encargada del monitoreo de la calidad del aire es el Área Metropolitana de Bucaramanga (AMB), con su programa Eolo, que consta de 5 estaciones de monitoreo de Material Particulado 2,5 (PM 2,5), ubicadas en Santa Cruz (Guirón), Lagos I (Floridablanca), San Francisco, Lagos del Cacique y La Ciudadela (Bucaramanga); en el mes de marzo del año 2020, 4 de estas estaciones registraron cifras entre 151-200 que corresponden al rango de dañino para la Salud (Área Metropolitana de Bucaramanga, 2020), según el Índice de Calidad del Aire (ICA) (Hernández Hernández, 2013). Una alternativa cada vez más empleada para disminuir los índices de contaminación, es el uso de biocombustibles entre ellos biogás, biodisel, y bioetanol, este último al ser mezclado con la gasolina, logra reducir las emisiones de monóxido de carbono y aumentar un 60 % el tamaño del material particulado, reduciendo así el ingreso de este por vías respiratorias (Guo, Song, y Buhain, 2015).

El bioetanol se produce por la fermentación de glucosa, o de otros azúcares fermentables, utilizando diferentes microorganismos. Actualmente, la industria del bioetanol emplea la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de glucosa pues esta logra un rendimiento de aproximadamente 13 % de etanol a partir de 100 g\*L<sup>-1</sup> de glucosa en periodos de 24 h (Tejeda y cols., s.f.); también se han empleado algunas bacterias como *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp., o *Aeromonas* spp. y levaduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Kluyveromyces marxianus*, esta última representa una alternativa prometedora pues no sólo logra fermentar glucosa, sino también otras hexosas y pentosas derivadas de la hemicelulosa, además de ser termotolerante, logrando mantener su metabolismo activo a temperaturas cercanas a los 50°C (Fonseca, Heinzle,

Wittmann, y Gombert, 2008).

El bioetanol puede obtenerse de diversas fuentes y de acuerdo con estas puede clasificarse en etanol de primera, segunda y tercera generación. El etanol de primera es aquel que se obtienen de fuentes alimenticias ricas en almidón y azúcar, principalmente caña de azúcar o maíz (Alejos C y Calvo E, 2015); el etanol de segunda generación se obtiene a partir de biomasa lignocelulósica como residuos sólidos urbanos o residuos agrícolas (Eduardo, Salgado, y Perez, 2015) y el etanol de tercera generación se obtiene a partir de modificaciones genéticas para mejorar el crecimiento, rendimiento y características de las materias primas empleadas, además del uso de micro y macro algas como materia prima (Jambo y cols., 2016). Actualmente en Colombia el bioetanol se produce principalmente de cultivos de caña de azúcar o maíz por empresas como INCAUCA S.A.S, MANUELITA S.A y BIOENERGY S.A (Isabel Montoya, Andrés Quintero, Julián Sánchez, y Ariel Cardona, 2005), sin embargo, el empleo de monocultivos está generando serios problemas ambientales en el territorio nacional como el aumento de enfermedades y plagas por acumulación de desechos, desgaste en los nutrientes del suelo y contaminación de las fuentes hídricas cercanas (Altieri, s.f.); por lo tanto la biomasa lignocelulósica se proyecta como una materia prima sostenible ya que no contribuye al agotamiento de recursos naturales y su uso disminuye la acumulación de biomasa residual (cáscara de fruta, madera y hojas) (Ojeda, Quintero, Rondón, y Kafarov, 2009).

En los últimos años la investigación ha sido enfocada en encontrar fuentes de producción de bioetanol de segunda generación, empleando biomasa lignocelulósica agroindustrial como materia prima, entre ellos el bagazo de caña (Ojeda y cols., 2009) o el pseudotallo de plátano (Anderson, Pedro Nel, y Martha Lucía, s.f.); desde este punto de vista, los diferentes residuos obtenidos de los cultivos en el territorio nacional podrían ser utilizados como materia prima para la producción de bioetanol.

Actualmente una de las agroindustrias que genera mayor cantidad de residuos lignocelulósicos en el departamento de Santander es la industria cacaotera ya que es el mayor productor de cacao en Colombia con un 42,1 % equivalente a 25.158 Toneladas de granos secos (FEDECACAO, s.f.).

En la industria cacaotera solo se aprovecha económicamente la semilla, que representa el 10% del peso del fruto fresco y es utilizada en la fabricación del chocolate y sus derivados, dejando como subproductos el mucílago, testa y cáscara (García, Felipe, Quintero, Montoya, y Asociada, s.f.). La cáscara de la mazorca de cacao representa en promedio del 52 al 76% del total del fruto, se estima que la producción anual de cáscara es de aproximadamente 590.000 toneladas y está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, que se encuentran ensambladas en una estructura tridimensional compleja (Carpio, Castro, y Campo Fernández, s.f.); es precisamente por esta estructura compleja que se requieren pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos o biológicos, para poder dejar la celulosa y hemicelulosa disponible para el proceso de hidrólisis y de esta forma obtener jarabes fermentables (Quezada, Herrero, y Herguido, 2018).

Los tratamientos físicos, químicos y fisicoquímicos pueden dejar un alto contenido de compuestos que inhiben la fermentación y generan contaminación en el medio ambiente (Giovanni Cortes Ortiz, s.f.); por lo que el uso de enzimas en el pretratamiento e hidrólisis del material lignocelulósico usando lacasas y celulasas, son una alternativa no solo más amigable con el ambiente sino también reducen en gran medida la presencia inhibidores generando una mayor eficiencia en el proceso de fermentación (Viñals-Verde, Bell-García, Michelena-Álvarez, y Ramil-Mesa, 2012).

Por todo lo anterior en el presente trabajo de investigación se realizó un pretratamiento e hidrólisis simultáneos a la cáscara de mazorca de cacao con lacasas y celulasas, obteniendo así jarabes fermentables que fueron sometidos a fermentación anaerobia por la acción de *Kluyveromyces marxianus*.

## 1. Objetivos

### 1.1. Objetivo general

Producir etanol de segunda generación a partir de jarabes fermentables obtenidos por hidrólisis enzimática de cáscara de mazorca de cacao.

### 1.2. Objetivos específicos

- ✓ Obtener jarabes fermentables a partir de diferentes tamaños de partícula de la cáscara de mazorca de cacao CCN-51 mediante la hidrólisis enzimática.
- ✓ Caracterizar los jarabes fermentables generados a partir de la hidrólisis de la cáscara de mazorca de cacao.
- ✓ Producir etanol de segunda generación a partir de azúcares fermentables.

## 2. Marco teórico

### 2.1. El cacao

*Theobroma cacao* es un fruto endémico de las selvas tropicales de Sur América; la primera variedad en ser cultivado en la región fue el Cacao Criollo, pero por su alta susceptibilidad a las enfermedades y a su pobre rendimiento agronómico fue necesario empezar a introducir otros híbridos más resistentes (Argout y cols., 2011); este fruto es bastante apreciado en el mercado, pues de él se fabrican productos de confitería, uso medicinal, repostería, entre otros (García y cols., s.f.). A pesar de ser un fruto nativo de América del Sur, su cultivo se extiende por toda la zona del Ecuador, teniendo así cultivos en África, Asia, Oceanía y América (Beg, Ahmad, Jan, y Bashir, 2017).

En Colombia, para el año 2019 el territorio nacional contaba con un área sembrada de 56.500

hectáreas (FEDECACAO, s.f.), en las que se cultivan 3 clases de cacao; criollo, forastero e híbrido (CCN-51) (Vásquez-Barajas, García-Torres, Bastos-Osorio, y Lázaro-Pacheco, 2018); el departamento de Santander se ubica como el principal productor del país, con un aporte del 42,1 % de la producción total (FEDECACAO, s.f.). En Colombia solo el grano es el que representa un interés monetario, pues para el 2019 se exportaron aproximadamente 9.000 toneladas de las 59.740 producidas (FEDECACAO, s.f.), lo que deja como desechos la testa, mucílago y cáscara; de esta última se desechan aproximadamente 10 kg por cada kg de grano seco (Ortiz-Valbuena y Álvarez-León, 2015) por lo que para el 2019 el país dejó un aproximado de 590.000 toneladas de cáscara como desecho, perdiendo así una materia prima con gran potencial en la industria, pues esta tiene un gran contenido de celulosa y hemicelulosa (Tabla 1) (Carpio y cols., s.f.), lo que convierte a este material lignocelulósico en una potencial materia prima para la producción de jarabes fermentables (Quezada y cols., 2018).

**Tabla 1.** *Composición de la biomasa lignocelulósica de la mazorca del Cacao CCN-51, adaptado de Carpio y cols., s.f.*

<b>Componente</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Celulosa	53,7
Hemicelulosa	18,7
Lignina	25,7
Cenizas	2,00

## 2.2. Producción de jarabes fermentables

Los jarabes fermentables se componen principalmente de glucosa, otros azúcares reductores derivados de la celulosa y hemicelulosa y compuestos fenólicos derivados de la degradación de lignina (Cuervo, Folch-Mallol, Estela, y Castañeda, s.f.), si provienen de material lignocelulósico. La celulosa y hemicelulosa se encuentran unidas covalentemente a la lignina por lo que es necesario el uso de tratamientos que la remuevan o degraden, para así poder hidrolizar los enlaces glucosídicos de estos polímeros de azúcares y así obtener azúcares más simples que puedan ser metabolizados por

los microorganismos (bacterias o levaduras); estos tratamientos pueden ser físicos, fisicoquímicos, químicos o biológicos (Giovanni Cortes Ortiz, s.f.).

### **2.2.1 Pretratamiento**

Los pretratamientos físicos son aquellos que implican un cambio en las propiedades físicas del material, pero no afectan sus propiedades químicas, estos se hacen con el fin de aumentar el área de contacto entre material lignocelulósico y los tratamientos químicos y biológicos. Entre los tratamientos físicos encontramos la fragmentación mecánica y pirólisis (Giovanni Cortes Ortiz, s.f.).

Los pretratamientos fisicoquímicos permiten aumentar el nivel de sacarificación del material lignocelulósico, la ventaja de estos tratamientos es que requieren menos energía que los tratamientos mecánicos y no se producen compuestos inhibidores de la fermentación. Entre los tratamientos fisicoquímicos se encuentra la explosión de vapor y la explosión de fibra con amoníaco (Giovanni Cortes Ortiz, s.f.).

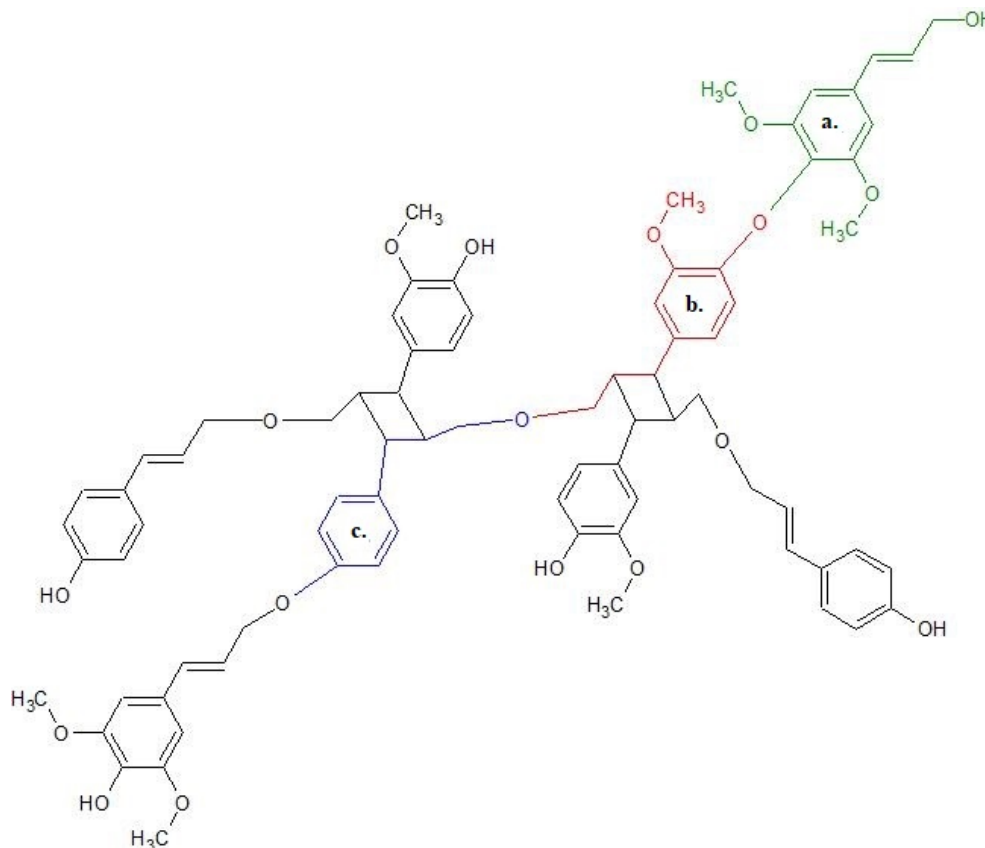
Los pretratamientos químicos consisten en someter el material (previamente triturado) a una serie de reacciones químicas con el fin de hidrolizar la celulosa, hemicelulosa y lignina; la desventaja de estos tratamientos es que algunos liberan muchos compuestos inhibidores que afectan el proceso de hidrólisis y fermentación, tienen altos costos por los reactivos usados y generan corrosión en los equipos implementados. Dentro de estos se encuentra la ozonólisis, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y deslignificación oxidativa (Giovanni Cortes Ortiz, s.f.).

Los pretratamientos biológicos son usados por el poco impacto ambiental que generan, ya que en estos se emplean microorganismos o enzimas extraídas de estos mismos, evitando así el uso de ácidos o bases fuertes y de solventes volátiles; adicionalmente son tratamientos muy eficientes a condiciones moderadas, y se tienen emisiones casi nulas de compuestos inhibidores de la fermentación (Kirk y Jeffries, 1996). Dentro de los tratamientos biológicos se encuentran los tratamientos con microorganismos (bacterias y hongos) y sus enzimas; los microorganismos de la podredumbre blanca y parda, entre ellos *Fusarium concolor*, *Coriolus versicolor*, *Trametes*

*versicolor*, entre otros producen enzimas lignolíticas que oxidan la madera (Balan y cols., 2008) generando la deslignificación de material lignocelulósico (Zhang, Xu, y Wang, 2007) (Li, Li, Tang, Zhao, y Qu, 2008). Las enzimas lignolíticas además de degradar la lignina, también oxidan los compuestos fenólicos presentes en el material lignocelulósico. El uso de enzimas posee algunas ventajas ya que no requieren altas temperaturas para tener su actividad óptima, adicionalmente, no se requiere de pH inferior a 4.5, por lo que se disminuye la liberación de compuestos inhibidores de la fermentación como compuestos fenólicos, furaldehídos (hidroximetilfurfural (HMF) y furfural) y ácidos alifáticos (acético, fómico y levulínico) (Johnny y cols., s.f.). Las enzimas más utilizadas para el pretratamiento de material lignocelulósico son las oxidoreductasas (lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa), las enzimas lacasas cumplen la función de oxidar la lignina, que es un polímero de compuestos fenólicos y no fenólicos, como se observa en Figura 1; la lignina es uno de los biopolímeros que más abunda en las plantas, estando presente en todas las plantas vasculares y se forma mediante las reacciones que ocurren durante la fotosíntesis (Chávez-Sifontes y Domine, 2013). La lacasa es una enzima que se clasifica como polifenol oxidasa y tiene amplia especificidad por compuestos aromáticos que contienen grupos hidroxilo y amino; esta requiere de la presencia de 4 iones de cobre distribuidos en 3 sitios de unión. La lacasa cataliza la abstracción de un electrón del grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos en la lignina, produciendo radicales fenoxi, estos radicales atacan a otros compuestos para así despolimerizar la lignina. Los compuestos no fenólicos no pueden ser degradados por la lacasa, no obstante, se cree que esta oxidación puede ocurrir con la presencia de un medidor como el 2,2'-azinobisz(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) [(Youn, Hah, y Kang, 2006).

**Figura 1.**

*Estructura de la lignina y sus componentes; a, alcohol sinapílico; b, alcohol coniferílico; c, alcohol cumarílico. Adaptado de Chávez-Sifontes y Domines., 2013.*

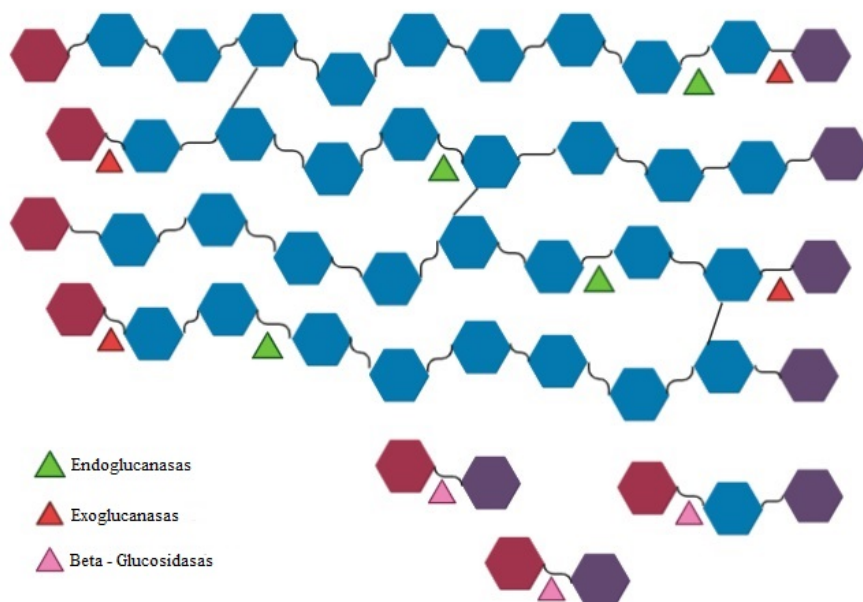


### 2.2.2 Hidrólisis

Las enzimas hidrolasas, en este caso particular las celulasas, tienen la capacidad de degradar la celulosa rompiendo sus enlaces glucosídicos  $\beta(1 - 4)$ , entre las más importantes podemos encontrar las endoglucanasas, exoglucanasas y betaglucosidasas. Las endoglucanasas son las encargadas de romper enlaces  $\beta(1 - 4)$  al azar de la cadena de celulosa, liberando así polímeros con cadenas más pequeñas de glucosa; las exoglucanasas se encargan de cortar de manera sucesiva en los extremos reductores y no reductores del polímero, liberando así glucosa y celobiosa; y las betaglucosidasas se encargan de realizar la hidrólisis en los enlaces de la celobiosa, garantizando así una liberación completa de glucosa para el jarabe glucosado, como se observa en la Figura 2 (Peralta y cols., 2017).

**Figura 2.**

*Representación de la hidrólisis enzimática de la celulosa. Adaptado de Peralta y cols., 2017*



### 2.2.3 Desintoxicación e hidrólisis simultáneas

El tratamiento biológico de desintoxicación e hidrólisis simultáneas es una alternativa bastante interesante, pues al ser un tratamiento enzimático las condiciones para ser llevado a cabo no son extremas. Este tratamiento enzimático incluye principalmente enzimas oxidorreductasas (lacasas) e hidrolasas (celulasas o xilanasas) capaces de degradar la lignina e hidrolizar la celulosa o hemicelulosa (Viñals-Verde y cols., 2012). Se ha demostrado que la acción de enzimas lignolíticas como las lacasas aumentan significativamente la hidrólisis de residuos lignocelulósicos cuando se combina con celulasas, aumentando la cantidad de azúcares fermentables producidos a partir de la biomasa vegetal (Arana, Tellez, y González, 2002). Esta mejora está relacionada con la oxidación de compuestos fenólicos, subunidades de la lignina, y la generación de radicales libres producidos mediante la despolimerización de la lignina, que son inhibidores de la hidrólisis y futura fermentación (Xu, Lin, Zang, y Shi, 2018).

## 2.3. Caracterización de jarabes fermentables

### 2.3.1 *Cuantificación por espectrofotometría UV-Vis*

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica que permite cuantificar la concentración de compuestos en solución; esto se debe a que la cantidad de luz absorbida por las moléculas depende de forma lineal de la concentración de los compuestos, según la Ley de Beer-Lambert, cabe resaltar que esto se cumple para soluciones diluidas y absorbancias no mayores a 1; en esta técnica se elaboran curvas de calibración con estándares de un compuesto de concentración conocida, para determinar la concentración de este compuesto en una muestra problema (Skoog, Holler, y Crouch, 2017).

### 2.3.2 *Caracterización por RMN $^1H$*

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una mespectroscopía que se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos, en el caso de la RMN  $^1H$ , se basa en las propiedades magnéticas del protón; la importancia de esta técnica es que los electrones que rodean el núcleo de interés van a causar ciertas modificaciones en el espectro resultante, siendo estas modificaciones de vital interés para la identificación de ciertos compuestos, pues estos efectos electrónicos son los que dan lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento (Elguero, Alkorta, Pardo, Claramunt, y Santa María, 2013). La RMN  $^1H$  es una herramienta bastante efectiva para la identificación de compuestos orgánicos en solución, pero dichas soluciones deben someterse a un proceso de secado y el sólido obtenido se debe disolver en agua deuterada ( $D_2O$ ), ya que la señal del agua alrededor de los 4.8 ppm puede generar una interferencia en el espectro y solapar otras señales (Caligiani, Acquotti, Palla, y Bocchi, 2007). La forma más fácil de hacer dicha identificación es por el desplazamiento químico de los protones reportados en las bases de datos de compuestos orgánicos, como la SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS, SDBS (AIST, s.f.). Pero la identificación de compuestos orgánicos no es una mera comparación, ya que en solución encontramos diversos compuestos orgánicos juntos, por lo que sus señales pueden solaparse en

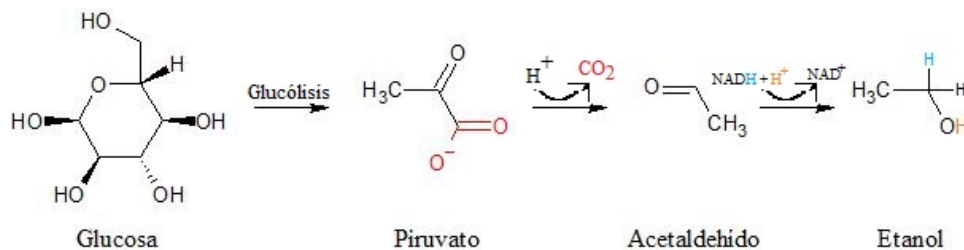
ciertas regiones del espectro (Caligiani, Acquotti, Cirlini, y Palla, 2010), esto ocurre en el caso de los azúcares reductores, que ven sus señales solapadas en la región de 3 a 5 ppm, pero algunos como la glucosa, fructosa y sacarosa ya que presentan señales plenamente identificables a 5,209, 3,551 y 5,412 ppm. Para los compuestos inhibidores como polifenoles y ácidos orgánicos es mucho más sencilla su identificación; los polifenoles presentan señales bien definidas alrededor de los 7 ppm y los ácidos orgánicos, como el ácido acético, láctico, succínico, cítrico, málico y fórmico, se ubican entre 1 y 3 ppm, con señales bien identificables (Caligiani y cols., 2010). Hay que resaltar que la intensidad de las señales dependerá de la cantidad del compuesto presente en solución, comparada con la señal del ácido trimetilsililpropanoico (TSP), compuesto patrón empleado para cuantificación (Caligiani y cols., 2007).

#### 2.4. Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico por medio del cual un organismo convierte carbohidratos en un alcohol o en un ácido orgánico. Ocurre cuando el piruvato, producto de la glucólisis, se descompone en etanol y dióxido de carbono; en condiciones anaerobias, el etanol se produce a partir de acetaldehído (Figura 3) (Maicas, 2020).

**Figura 3.**

*Fermentación alcohólica. Adaptado de Maicas, 2020.*



En Colombia la producción de etanol es principalmente de primera generación, usando como materia prima la caña de azúcar (Isabel Montoya y cols., 2005); además, la levadura más usada es la *Saccharomyces cerevisiae*, ya que esta logra fermentar jarabes azucarados con concentraciones de

casi  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa en alrededor de 24 horas, logrando concentraciones de cerca del 13 % de etanol, esto en condiciones anaerobias a  $30^\circ\text{C}$  y un pH entre 4,5 y 5, con una agitación de 200 rpm; además porque esta se comercializa en su forma activa seca (Tejeda y cols., s.f.). A pesar de que la *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más conocida por su aplicación antes mencionada, existen una gran diversidad de levaduras con aplicaciones en la investigación de genética moderna, biología molecular y biología celular, dentro de los géneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debarromyces* y *Yarrowia* (Lane y Morrissey, 2010); un ejemplo es la *Kluyveromyces marxianus* que además de su capacidad para fermentar hexosas, también puede de fermentar pentosas; además, es altamente termo tolerante, por lo que puede llevar a cabo la fermentación a temperaturas cercanas a los  $52^\circ\text{C}$  (Fonseca y cols., 2008). Esto convierte a *Kluyveromyces marxianus* en un microorganismo con un gran potencial biotecnológico.

*Kluyveromyces marxianus* fue descrita por primera vez en 1888 por EC Hansen, pero no existe una secuencia del genoma disponible públicamente, pero si existe un amplio estudio sobre el potencial biotecnológico de esta, sin ahondar en su funcionamiento a nivel intracelular (Lodder, Acomina], y Kreger-van Rij, 1952). Estudios lograron demostrar que la *Kluyveromyces marxianus*, al igual que *S. Cerevisae*, es una levadura respiro-fermentativa, lo que le permite generar energía a través del Ciclo de Krebs por fosforilación oxidativa o por fermentación a etanol (Lane y Morrissey, 2010), pero *Kluyveromyces marxianus* posee un carácter negativo a Crabtree, lo que significa que esta levadura requiere indispensablemente de condiciones anaerobias para poder llevar a cabo la producción de etanol por fermentación, de lo contrario su metabolismo se dirige al Ciclo de Krebs (Kiers y cols., 1998); esto puede ser porque la presión de oxígeno afecta la viabilidad de las células, pues estudios lograron demostrar que al tener una presión de oxígeno de 1,2 Bar, la viabilidad de las células se reduce a sólo 25 % (Pinheiro, Belo, y Mota, 2002).

### 3. Parte experimental

#### 3.1. Materia Prima

Las mazorcas de cacao CCN-51 fueron obtenidas de un cultivo en San Vicente de Chucurí, municipio ubicado en Santander, Colombia. Las mazorcas se sometieron a un proceso de fraccionamiento y despulpado para obtener la cáscara, la cual se trató posteriormente con un proceso de disminución de tamaño de partícula en un molino de cuchillas con posterior secado y almacenamiento; este proceso se llevó a cabo por personal del laboratorio 408 del Edificio de Investigación del Parque Tecnológico Guatiguará. El material triturado se separó usando tamices de mallas 10, 16, 20, 40, 60, 80, 120 y >120 Mesh (Beg y cols., 2017).

#### 3.2. Obtención de jarabes fermentables

##### 3.2.1 *Pretratamiento e hidrólisis enzimática simultaneas*

La cáscara de mazorca de cacao (CMC) con pretratamiento físico y tamizada fue esterilizada a 121°C por 15 minutos y 125 lb de presión para disminuir la carga de microorganismos. Para obtener los jarabes fermentables se preparó el biorreactor con una solución enzimática de 10% v/v de celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 a 200 UPF\*mL<sup>-1</sup> y 10% v/v de lacasas comerciales de *Trametes versicolor* a 400 UI\*mL<sup>-1</sup> en buffer citrato pH 5,0 a 50 mM y CuSO<sub>4</sub> a 2,5 mM en un volumen final de 10 mL. Posteriormente se agregó 1,5 g de CMC (proporción 1,5:10 w/v biomasa/solución enzimática) y se mezcló durante 30 segundos usando vórtex. La mezcla se incubó a 45°C en baño maría durante 120 horas y sin agitación (Oyetuji, 2015). Una vez transcurridas las 120 horas, se centrifugaron los biorreactores a 9000 rpm, por 10 minutos, para sedimentar la CMC suspendida en el jarabe fermentable. Finalmente se separó el sobrenadante y se filtró con muselina (Mendoza-Vargas, Jiménez-Forero, y Ramírez-Niño, 2017). Adicionalmente, para cada tamaño de partícula se dispuso un blanco que consiste en la CMC en la solución buffer sin enzimas,

estos blancos se sometieron al mismo tratamiento térmico durante 120 horas. La cuantificación de la liberación de glucosa y azúcares reductores se normalizó restandole sus respectivos blancos.

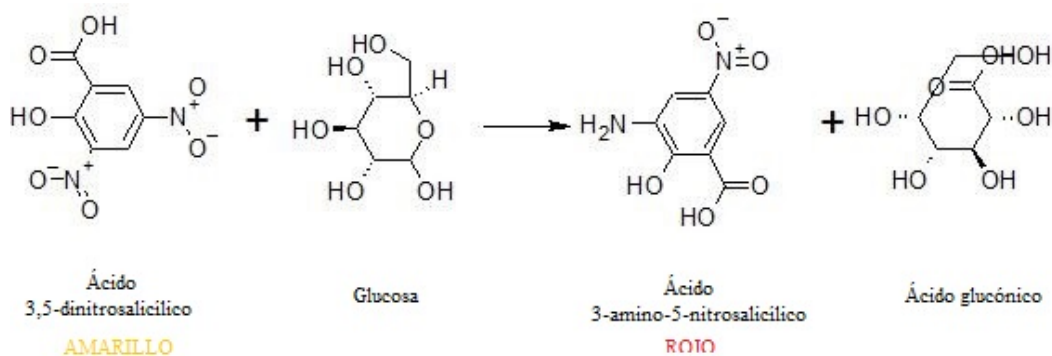
Dentro del Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) de la Universidad Industrial de Santander, la magíster en microbiología Yarileny Castellanos Villamizar realizó la validación del método de producción de jarabes fermentables a partir de la cascara de la mazorca de cacao CCN-51 triturada. Este método se validó para el material triturado retenido en la malla 40 Mesh; en este proyecto se llevó a cabo el pretratamiento e hidrólisis simultáneos en otros tamaños, retenidos en las mallas 10, 16, 20, 40, 60, 80, 120 y >120 Mesh. Las variables de respuesta fueron la concentración de azúcares reductores totales, concentración de glucosa y concentración de compuestos fenólicos.

### **3.2.2 *Determinación de la actividad enzimática***

La actividad celulolítica se midió en función de los azúcares reductores liberados de 2 mg de papel filtro y se expresó en Unidades de Papel Filtro (UPF) que corresponden a  $\text{mmol} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Esta se determinó teniendo en cuenta el protocolo descrito por Y. H. Percival Zhang, Jiong Hong, Xinhao Ye usando papel de filtro (FPA) como sustrato (Bernal Juárez, 2013). Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de la enzima suspendida en 1 mL de buffer citrato (50 mM – pH 4.8) y 5 mg de papel filtro Whatman N° 1 (1 cm x 6 cm); la mezcla se incubó durante una 1 h, a 50°C y se evaluó la capacidad para liberar azúcares a partir del papel de filtro, cuantificada por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Figura 4) (Tena y Jorin, 2010), empleando una curva de calibración de glucosa como patrón. La lectura se realizó en microplaca usando un espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Fisher Multiskan™ GO, a 540 nm.

**Figura 4.**

*Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con un azúcar reductor. Adaptado de Tena y Jorriin, 2010.*



La actividad lacasa se determinó por la oxidación del ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS), la reacción consistió en la mezcla de 150  $\mu\text{L}$  de buffer acetato 60 mM pH=4,5, 40  $\mu\text{L}$  de la enzima (previamente re suspendida en buffer fosfato 50mM pH=7,0) y 10  $\mu\text{L}$  del ABTS; las lecturas se realizaron en microplaca usando un espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Fisher MultiskanTM GO a 415 nm, y la actividad se calculó según la ecuación 1.

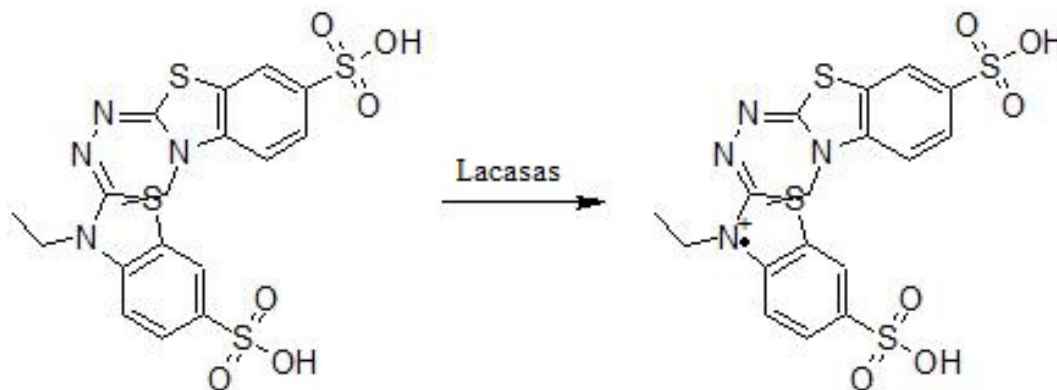
$$\frac{\Delta ABTS * V_T * F_D}{t_m * \epsilon * V_m * P_C} \quad (1)$$

Donde  $\Delta ABTS$  es la lectura de la absorbancia final menos la absorbancia inicial,  $V_T$  es el volumen total de reacción (mL),  $F_D$  es el factor de dilución,  $t_m$  es el tiempo de medición (min),  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del sustrato ( $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ),  $V_m$  es el volumen de la muestra (mL) y  $P_C$  es la longitud del pozo (cm).

La relación enzima-sustrato de la oxidación del ABTS por acción de las lacasas (Figura 5) (Kadnikova y Kostickostic, 2002), a través del tiempo, se muestra en el programa Skaint RE for Multiskan GO 3,2 como una línea recta con ángulo de  $45^\circ$  que me indica una relación 1 a 1 (Johannes y Majcherczyk, 2000).

**Figura 5.**

*Transformación del ABTS por acción de las Lacasas. Adaptado de Kadnikova y Kostickostic, 2002.*



### 3.3. Cuantificación y caracterización de los jarabes fermentables

Se realizó la cuantificación de azúcares reductores, glucosa, compuestos fenólicos, con ayuda de la espectrofotometría UV-Vis; adicionalmente, la caracterización de los compuestos presentes en el jarabe se realizó tomando el espectro RMN <sup>1</sup>H.

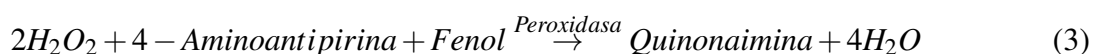
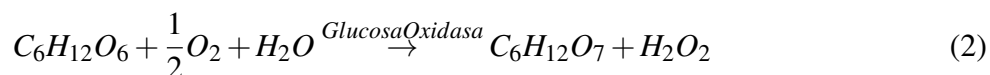
#### 3.3.1 Cuantificación de azúcares reductores totales

Los azúcares reductores se cuantificaron por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) empleando una curva de calibración de glucosa como patrón (Ramón y cols., 2015). Para la determinación se tomaron 125  $\mu$ L del jarabe fermentable obtenido y se le adicionaron 125  $\mu$ L de reactivo DNS, posteriormente se llevaron a un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, finalizado este tiempo se realizó choque térmico con hielo por 2 minutos, finalmente se agregaron 1250  $\mu$ L de agua destilada. La lectura se realizó en microplaca usando un espectrofotómetro UV-Vis, a 540 nm.

#### 3.3.2 Cuantificación de glucosa

La cuantificación de glucosa en los jarabes fermentables se realizó usando el protocolo del kit de glucosa oxidasa/peroxidasa de BioSystems S.A.S (BioSystems, s.f.); esta cuantificación se

fundamenta en las reacciones acopladas (ecuaciones 2 y 3) ya que el compuesto coloreado formado es el que permite la cuantificación.



Para la determinación se tomó 1 mL de la solución de la enzima glucosa oxidasa y se mezcló con 10  $\mu$ L del jarabe fermentable obtenido; la mezcla de la reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (16 – 25 °C). La concentración de glucosa fue determinada por el cociente de la absorbancia de la muestra sobre la absorbancia del patrón de glucosa. La lectura se realizó en microplaca usando un espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Fisher MultiskanTM GO, a 506 nm.

### 3.3.3 Cuantificación de compuestos fenólicos

Para la cuantificación compuestos fenólicos se empleó una modificación de la técnica estandarizada de Folin-Ciocalteu con una curva de calibración de ácido gálico como patrón (Singleton, Orthofer, y Lamuela-Raventós, 1999). La determinación se realizó agregando en orden 25  $\mu$ L del jarabe fermentable obtenido, 25  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu, 200  $\mu$ L de agua destilada, 250  $\mu$ L de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 70g/L, 100  $\mu$ L de agua destilada. La reacción se incubó durante 1 hora en oscuridad y la lectura se realizó en microplaca usando un espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Fisher MultiskanTM GO, a 760 nm.

### 3.3.4 Caracterización con RMN <sup>1</sup>H

La caracterización y cuantificación de los diferentes compuestos presentes en el jarabe fermentable se realizó con el espectro RMN <sup>1</sup>H del jarabe liofilizado, para garantizar que la señal del agua

no generara interferencias en el espectro pues esta señal se encuentra cercana a la zona de la señal de los azúcares. Los espectros se tomaron a 308 K con pulsos de 90° y se archivaron después de 32 barridas. Las muestras se prepararon disolviendo el producto sólido de la liofilización en agua deuterada (D<sub>2</sub>O) y usando un estándar interno de 3-(trimetilsilil) propionato-d<sub>4</sub> (TSP) (Caligiani y cols., 2010). Los espectros obtenidos se procesaron con el software Mestre NOVA.

Para el análisis cuantitativo se tuvo en cuenta la integración de las señales seleccionadas y se compararon con el área del TSP (Caligiani y cols., 2010). Para la cuantificación fue necesario conocer cuántos hidrógenos del núcleo contribuyen a la señal del analito y del patrón interno, esto para poder calcular el peso equivalente (Pe), que correspondía al cociente entre peso molecular del compuesto y el número de hidrógenos que contribuían a la señal; pues la masa del compuesto (mg<sub>x</sub>) y del patrón interno (mg<sub>TSP</sub>) se relacionaban como se muestra en la ecuación 4.

$$\frac{A_x * Pe_x}{mg_x} = \frac{A_{TSP} * Pe_{TSP}}{mg_{TSP}} \quad (4)$$

Donde A<sub>x</sub> es el área de integración del analito, A<sub>TSP</sub> el área de integración del estándar interno, Pe<sub>x</sub> el peso equivalente del analito y Pe<sub>TSP</sub> el peso equivalente del estándar interno (Caligiani y cols., 2007).

### 3.4. Producción de etanol

#### 3.4.1 Cepa e inóculo

La fermentación de los jarabes obtenidos en la sección 3.2 se realizó utilizando la cepa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* DMS 5418. Esta cepa se eligió ya que presenta altos rendimientos en la fermentación y por su capacidad de fermentar hexosas y pentosas (Lane y Morrissey, 2010); además de ser termo tolerante, por lo que puede trabajarse a elevadas temperaturas (Arismendy, Sequeira, Felissia, Area, y Chamorro, 2018).

### 3.4.2 *Fermentación con Kluyveromyces marxianus*

La fermentación se realizó por triplicado en biorreactores de 120 mL con un volumen de reacción de 80 mL de jarabe glucosado obtenido en la hidrólisis enzimática, suplementado con los componentes del medio de cultivo cezapek,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$ ,  $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4$ ,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  extracto de levadura,  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  peptona, y en medio cezapek suplementado con la misma cantidad de glucosa de los jarabes fermentables. Los biorreactores se inocularon añadiendo el 10% de volumen total del pre-inóculo con una concentración aproximada de  $1,5 \times 10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$  de la levadura *Kluyveromyces marxianus* DMS 5418. Se incubó hasta 10 horas, implementando las condiciones óptimas arrojadas por el diseño de experimentos estandarizado previamente en el laboratorio 404 del Parque Tecnológico Guatiguará por los microbiólogos Eliana Castillo Fonce y Edimerk Mauricio Gil Guiza ( $36^\circ\text{C}$  y 55 rpm), y se evaluó cada hora el consumo de glucosa, azúcares reductores y la producción de etanol; las muestras fueron obtenidas por centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , sedimentando la biomasa de la levadura *Kluyveromyces marxianus*. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de azúcares reductores por el método del DNS, glucosa por el método glucosa oxidasa/peroxidasa y etanol por el método de extracción con solvente TBP (tri-n-butil fosfato) y oxidación con el Dicromato de Potasio.

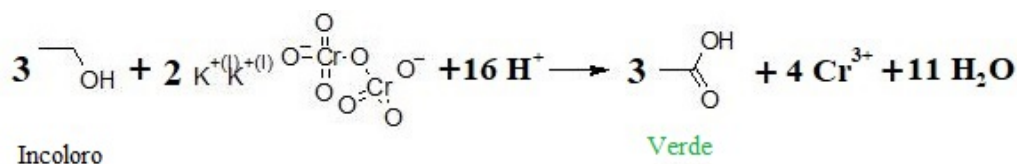
### 3.4.3 *Cuantificación de etanol*

Para la cuantificación de etanol se siguió el protocolo establecido por Hyun-Beom Seo empleando una curva de calibración de etanol como patrón (Seo y cols., 2009). El primer paso incluye una extracción líquido-líquido con tributil fosfato (TBP) para eliminar restos de glucosa, extracto de levadura, peptona y otros compuestos presentes en el jarabe que puedan generar interferencias; esta extracción se realizó mezclando  $300 \mu\text{L}$  del TBP con  $300 \mu\text{L}$  de la muestra y se agitó en vórtex por 1 hora a temperatura ambiente; posteriormente, se colectaron  $250 \mu\text{L}$  de la fase orgánica de

la extracción (fase superior) en un tubo que contenía 250  $\mu\text{L}$  del reactivo dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  al 10 % v/v en una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5M), esta mezcla se agitó en vórtex por 30 minutos. Posterior al tiempo de agitación, se dejó en reposo, finalmente se colectaron 200  $\mu\text{L}$  de la fase inferior de la reacción para la lectura en microplaca usando un espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Fisher MultiskanTM GO a 585 nm. La oxidación del etanol con dicromato de potasio en medio ácido se muestra en la Figura 6 (Sáez-Plaza, Martín, y Asuero, 2017).

**Figura 6.**

*Oxidación del etanol por acción del dicromato de potasio en medio ácido.. Adaptado de Sáez-Plaza, Martín, y Asuero, 2017.*



#### 4. Resultados y discusión

##### 4.1. Tamizado de la mazorca de cacao CCN-51

Los resultados del tamizado, de la mazorca de cacao CCN-51 triturada con los números de malla 10, 16, 20, 40, 60, 80, 120 y >120 Mesh, se reportan en la Tabla 2.

**Tabla 2.**

*Porcentaje del peso de cada tamaño de partícula sobre el peso total.*

Malla (Mesh)	mm	Peso (g)	Porcentaje (%p/p)
10	2,000	364,0	1,3
16	1,180	6811,4	24,3
20	0,850	6211,1	22,2
40	0,425	7023,6	25,1
60	0,250	3936,4	14,1
80	0,180	1735,3	6,2
120	0,125	885,4	3,2
Fondo (>120)	≤ 0,125	1028,9	3,7
Total	-	27996,1	100

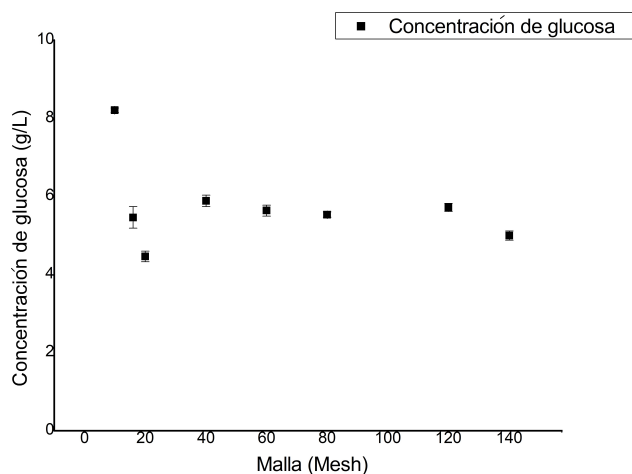
Como puede observarse en la Tabla 2, el material retenido en la malla 40 (0.425 mm) es el que mayor porcentaje presenta dentro del total del material con un 25.1% y el de menor porcentaje sería el retenido en la malla 10 (2.00 mm) con un 1.3%. La celulosa no se hidroliza fácilmente si se encuentra en su forma cristalina, por lo que la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\beta$  (1 - 4) ocurre de forma eficiente si la celulosa es amorfa (Peralta y cols., 2017); esto justifica el tratamiento físico realizado, pues la reducción del tamaño de partícula hace que la celulosa pierda su cristalinidad y además otorga una mayor área de contacto para las enzimas durante la hidrólisis (Cuervo y cols., s.f.).

#### 4.2. Pretratamiento e hidrólisis

Después de las 120 horas de tratamiento enzimático se obtuvieron aproximadamente 8 mL de jarabes fermentables de cada tamaño de partícula. En la Figura 7 y la Figura 8 se presentan los resultados normalizados de la liberación de glucosa y otros azúcares reductores y en la Figura 9 se presenta la comparación en la liberación de compuestos fenólicos entre el blanco de reacción y el jarabe fermentable.

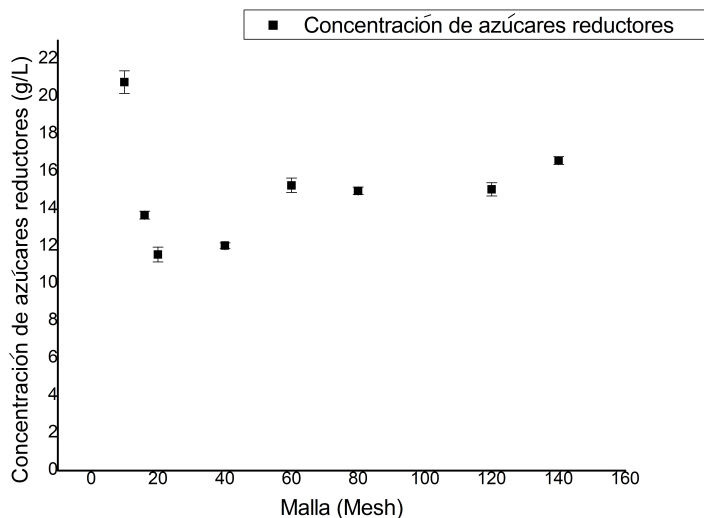
**Figura 7.**

*Concentración normalizada de glucosa ( $g \cdot L^{-1}$ ) de los ocho jarabes fermentables.*



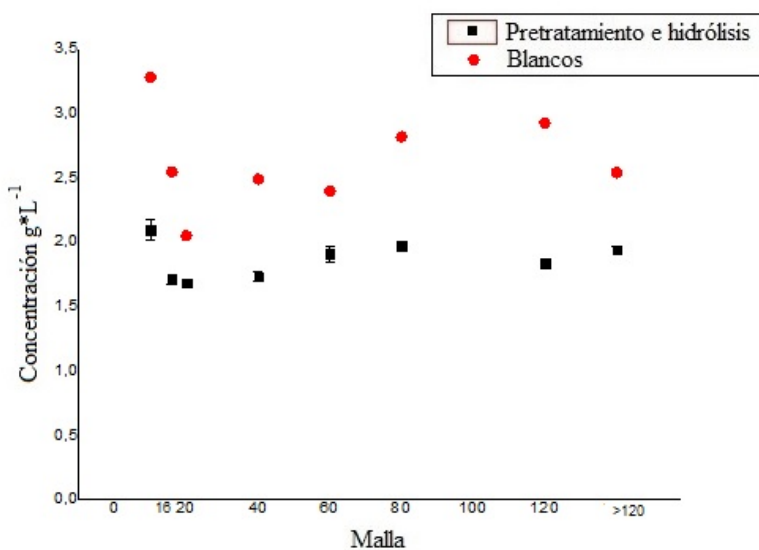
**Figura 8.**

*Concentración normalizada de azúcares reductores ( $g \cdot L^{-1}$ ) de los ocho jarabes fermentables.*



**Figura 9.**

*Comparación de la concentración de compuestos fenólicos ( $g \cdot L^{-1}$ ) de los ocho jarabes fermentables con sus respectivos blancos.*



Se esperaba que a medida que el tamaño de partícula descendiera, la concentración de glucosa y azúcares reductores liberados aumentara (Franco, Yépes, y Sánchez, 2009), pero, como se observa

en la Figura 7 y la Figura 8, la mayor liberación de glucosa y azúcares reductores se dio en el tamaño de partícula de 2 mm y no se observa un patrón, o tendencia, de disminución o aumento a medida que se reduce el tamaño de partícula; esto puede ocurrir ya que durante la esterilización de la mazorca de cacao el material de menor tamaño de partícula, de 0,25 mm a  $\leq 0,125$  mm, se compacta por efecto de la presión, disminuyendo así el área de contacto entre la solución enzimática y el material lignocelulósico.

Por lo presentado en la Figura 7 se puede evidenciar que hay una liberación significativa de glucosa para todos los tamaños de partícula, comparados con el de malla 40 Mesh, que estandarizó la magíster en microbiología Yarileny Castellanos, esto abre paso a la posibilidad de aprovechamiento de todo el material lignocelulósico y no solo un tamaño de partícula en específico; además como se puede ver en la Figura 9, hay una reducción notoria de compuestos fenólicos entre los blancos y los ensayos con enzimas, por lo que se puede decir que las lacasas cumplen su función de desintoxicar el jarabe fermentable producido (Youn y cols., 2006). El jarabe fermentable con la mejor relación glucosa - compuestos fenólicos, es el producido por el tamaño de partícula retenido en la malla 40 Mesh, por esto se seleccionó para el proceso de fermentación.

### **4.3. Caracterización por RMN <sup>1</sup>H**

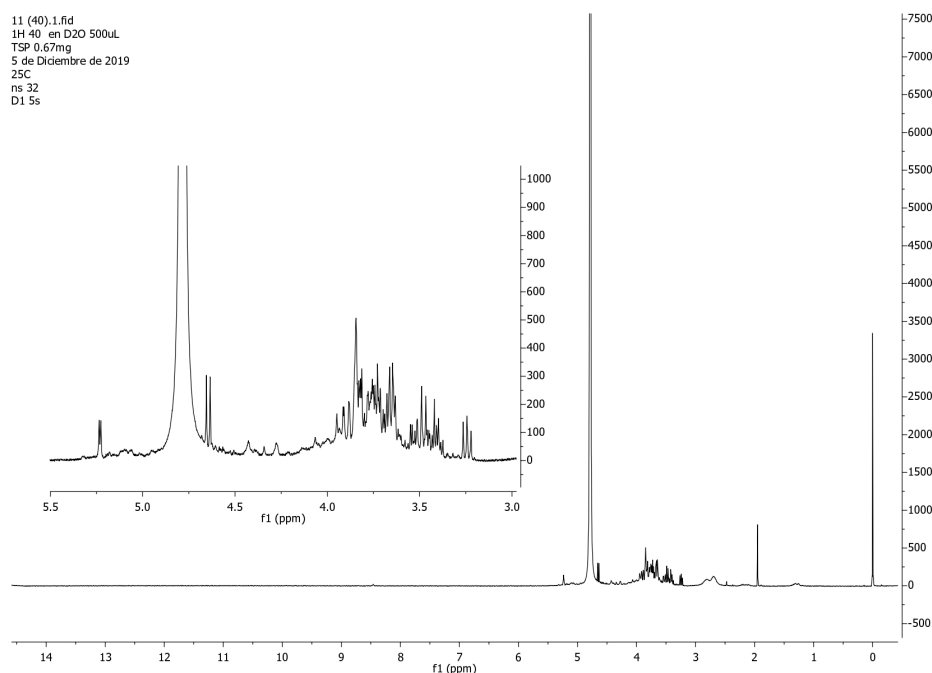
#### **4.3.1 *Análisis cualitativo***

En la Figura 10 puede observarse el espectros de RMN <sup>1</sup>H, para el jarabes obtenidos del tamaño de partícula retenidos en la malla 40 Mesh, con expansión en la zona característica de la región de azúcares (3 – 5,5 ppm), pues en dicha región es donde se evidencia una mayor población de señales.

Las señales se identificaron con ayuda de la base de datos SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS (SDBS) (AIST, s.f.), y la asignación para cada espectro se ve relacionada en la Tabla 3.

**Figura 10.**

*Espectro de RMN <sup>1</sup>H para el jarabe fermentable obtenido de la cáscara de mazorca de cacao retenida en la malla 40.*



**Tabla 3.**

*Asignación de las señales identificables del espectro RMN <sup>1</sup>H para el jarabe fermentable obtenido de la cáscara de mazorca de cacao retenida en la malla 40.*

Compuesto	Grupo	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad*	J (Hz)	No. De Hidrógenos
TSP	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,0000	s	-	9
Ácido Acético	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub>	1,9481	s	-	3
$\beta$ -D-Glucopiranososa	C <sub>4</sub> H	3,2432	m	-	1
$\beta$ -D-Glucopiranososa	C <sub>1</sub> H	4,6448	d	7,92	1
Agua	H <sub>2</sub> O	4,7850	s	-	2
$\alpha$ -D-Glucopiranososa	C <sub>1</sub> H	5,2314	d	3,73	1

\*Multiplicidad: s, singlete; d, doblete; m, multiplete.

Las especies químicas presentes en todos los ocho jarabes fermentables son las mismas, por lo que el análisis cualitativo es el mismo para todos y es el presentado según la Tabla 3.

Se evidencia presencia de especies químicas en la región alifática/alcohólica (0,8 – 3 ppm) y la región de azúcares (3 – 5,5 ppm) (Caligiani y cols., 2007); dentro de la región aromática/aldehído

(6,5 – 9,5 ppm) no se evidencia la presencia de ninguna especie química, por lo que se puede deducir que la concentración de compuestos fenólicos, inhibidores de la fermentación, en el jarabe fermentable se ve reducida por la acción de la lacasa como se mostró en la Figura 9 (Youn y cols., 2006), haciendo que estos no sea detectables (Caligiani y cols., 2010).

En la región alifática se evidencia un pico hacia los 1,9 ppm característico al  $\text{CH}_3$  del ácido acético, este compuesto está presente en el jarabe por el buffer acetato usado en la hidrólisis, aunque no se evidencie presencia del ácido cítrico del buffer citrato empleado en este mismo proceso. En la zona de azúcares se puede identificar los picos de la glucosa ( $\alpha$ -D-Glucosa y  $\beta$ -D-glucosa) y en la zona entre 3 y 4 ppm hay una superposición de picos de los diferentes azúcares reductores resultantes de la hidrólisis de la celulosa, que no pueden ser identificados por la interferencia que hace esta superposición (Caligiani y cols., 2010). Además, alrededor de 4,7 ppm se evidencia un pico de mayor tamaño, esta señal se asigna al agua, por lo que se comprueba que el proceso de liofilización fue adecuado para eliminar agua de la muestra y así evitar que esta solapara las señales de la glucosa. Al no encontrarse presencia de más especies químicas, se descarta la presencia de otros inhibidores de la fermentación.

#### **4.3.2 Análisis cuantitativo**

Todas las muestras presentan una concentración no superior a 0,2 mg de ácido acético, esto en aproximadamente 15 mg de cada muestra de jarabe liofilizado; este proviene del buffer acetato empleado en el proceso de desintoxicación e hidrólisis simultáneos, y aunque este presente en pequeñas cantidades, puede tener efecto negativo en el metabolismo de *Kluyveromyces marxianus*, al ser un inhibidor de la fermentación (Johnny y cols., s.f.).

**Tabla 4.***Concentración de glucosa en 15 mg de jarabe fermentable liofilizado*

<b>Malla</b>	<b>Peso de la muestra (mg)</b>	<b>Peso de TSP (mg)</b>	<b>Concentración Glucosa (mgx/mgTSP)</b>	<b>Concentración Glucosa (mgx/mgmuestra)</b>
10	14,8	0,3200	6,53	0,14
16	15,6	0,3700	5,81	0,14
20	15,2	0,3800	5,48	0,14
40	15,0	0,6700	5,32	0,24
60	15,3	0,5800	4,81	0,18
80	14,9	0,3300	3,73	0,08
120	15,0	0,4300	4,37	0,13
Fondo	14,9	0,4100	5,79	0,16

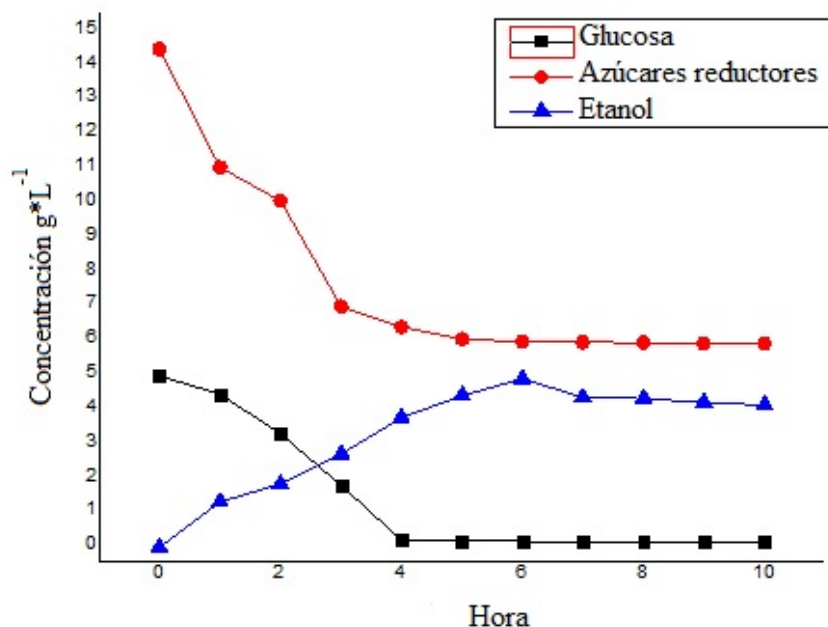
En la Tabla 4 se puede observar que, al igual que en el análisis por espectrofotometría UV-Vis, la concentración de glucosa no sigue un patrón o tendencia, a medida que disminuye el tamaño de partícula (Franco y cols., 2009), esto puede atribuirse a la formación de una masa compacta del material lignocelulósico, pues como se menciona en la patente No. 4967651 de los Estados Unidos, someter material de origen orgánico a condiciones de presión y temperatura extremas puede hacer que este pierda humedad provocando la formación de estas masas compactas (Hsieh, Johnson, y Dudek, 1990), esto reduce el área de contacto entre la solución enzimática y el material lignocelulósico, por lo que las enzimas no pueden hidrolizar de forma eficiente todo el material (Cuervo y cols., s.f.). Adicionalmente, se encuentra que el jarabe fermentable obtenido del tamaño de partícula de la malla 40 Mesh (0,425 mm) es el que contiene más glucosa, esto se puede atribuir a la mejor desintoxicación de compuestos fenólicos por acción de las lacasas, mostrada en la Figura 9.

#### **4.4. Fermentación**

Los resultados para la fermentación en jarabe fermentable se presentan en la Figura 11 y en medio cezapek se presentan en la Figura 12.

**Figura 11.**

Consumo de glucosa ( $g \cdot L^{-1}$ ) y consumo azúcares reductores ( $g \cdot L^{-1}$ ) y producción de etanol ( $g \cdot L^{-1}$ ) en el proceso de fermentación a escala de laboratorio bajo condiciones óptimas de temperatura y agitación, en jarabe fermentable

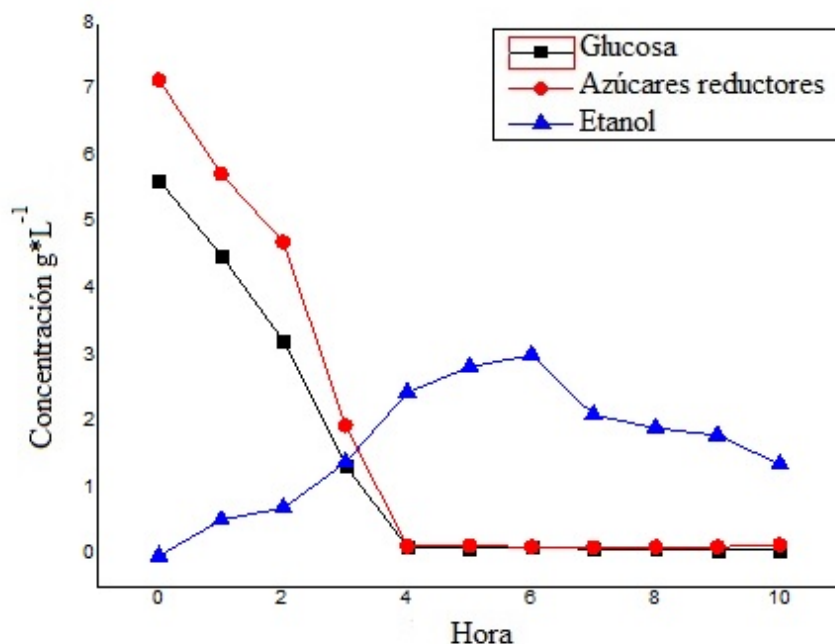


De acuerdo con lo observado en la Figura 11, la glucosa presente en los jarabes fermentables es consumida casi en su totalidad en las primeras 5 horas de fermentación, por tanto, para dicho momento la concentración de glucosa se encontró en  $0.093 g \cdot L^{-1}$ . Para el caso de los azúcares reductores, su disminución se dio de manera más lenta, lo cual se correlaciona con la capacidad metabólica de *Kluyveromyces marxianus*, que solo puede fermentar monosacáridos, ya sean hexosas o pentosas, y no los otros azúcares reductores, no identificados, producto de la hidrólisis de la celulosa que podrían ser disacáridos o polisacáridos de glucosa (Lane y Morrissey, 2010), culminando el tiempo de fermentación con  $5.841 g \cdot L^{-1}$ . Paralelo al consumo de glucosa, la concentración de etanol fue máxima en la hora 6 de fermentación, correspondiendo a un valor de  $4.825 g \cdot L^{-1}$ , que comparado con lo producido a partir de otros residuos lignocelulósicos como cáscara de piña ( $1,23 g \cdot L^{-1}$ ), cáscara de maracuyá ( $3,08 g \cdot L^{-1}$ ) (MARTHA MALAGÓN,

ADRIANA PÂEZ, ANDREA LACHE, 2017) o bagazo de caña ( $4,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Viñals-Verde y cols., 2012), la CMC da un buen rendimiento de producción etanol de segunda generación.

**Figura 12.**

Consumo de glucosa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y consumo azúcares reductores ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y producción de etanol ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en el proceso de fermentación a escala de laboratorio bajo condiciones óptimas de temperatura y agitación, en medio cezapek

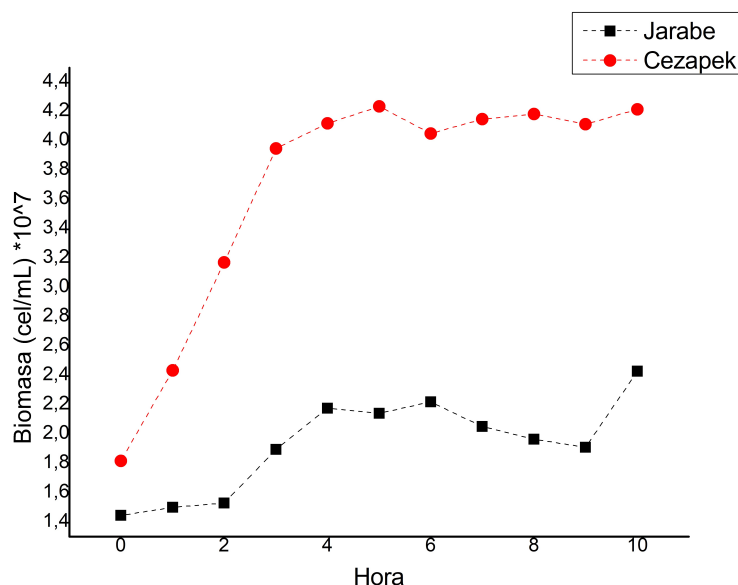


Según la Figura 12, el consumo de los azúcares en la fermentación con medio cezapek se da de forma similar que en el caso del jarabe fermentable. En lo observado, tanto la glucosa como los azúcares reductores se consumieron en las primeras 5 horas de fermentación, ya que este medio solo se encuentra suplementado con glucosa y no hay presencia de otros azúcares fermentables, registrando para dicha hora concentraciones de  $0.099 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $0.119 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente. Por otra parte, la concentración de etanol fue menor con respecto a lo registrado en la Figura 11, alcanzando así  $2.997 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , esto puede estar relacionado a con lo que se presenta en la Figura 13 pues, en este caso, *Kluyveromyces marxianus* emplea la glucosa para su reproducción y no para la

producción de etanol.

**Figura 13.**

Comparación de la biomasa de *Kluyveromyces marxianus* ( $\text{cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) obtenida en los dos medios de fermentación evaluados, correspondientes a jarabes fermentables y medio cezapek



En la Figura 13 se registró el crecimiento de la biomasa a lo largo del proceso de fermentación, comparando los dos medios de fermentación utilizados. De acuerdo con esto, y con el etanol obtenido en ambos medios, la levadura tiene un mejor comportamiento fermentativo (Lane y Morrissey, 2010) dentro del jarabe producido de CMC que en el medio cezapek, pues en el segundo emplea la glucosa disponible para su reproducción; la diferencia en el comportamiento de *Kluyveromyces marxianus* puede deberse a la presencia de los compuestos fenólicos y ácido acético liberados de la lignina (Padín González y Díaz Fernández, 2009), además de otros compuestos que pueden ser liberados de la CMC que no fueron cuantificados en este trabajo de grado, como grasas o compuestos nitrogenados; los compuestos fenólicos y el ácido acético, en grandes cantidades, son inhibidores de la fermentación, pero al estar presentes en cantidades tan pequeñas pueden tener un efecto contrario sobre *Kluyveromyces marxianus*, haciendo que su metabolismo se potencie para la

producción de etanol (Kiers y cols., 1998).

## 5. Conclusiones

A partir de diferentes tamaños de partícula de cáscara de mazorca de cacao se obtuvieron 8 jarabes fermentables mediante el pretratamiento e hidrólisis enzimática simultáneos, que contienen glucosa, otros azúcares reductores y compuestos fenólicos, principalmente.

La temperatura y el pH empleados no logran hidrolizar la celulosa sin la presencia de las celulasas y además comprobando la acción positiva de la lacasa en la desintoxicación de los jarabes por la oxidación de compuestos fenólicos, pues sin estas se tenía una mayor concentración de los mismos; además, se determinó que el jarabe con la mejor relación glucosa – compuestos fenólicos (5,881 – 1,732 g\*L<sup>-1</sup>), para la posterior fermentación, era el obtenido a partir del tamaño de partícula retenido en la malla 40 (0,425 mm).

Se confirmó por RMN <sup>1</sup>H la presencia en los jarabes fermentables de α-D-Glucopiranososa y β-D-Glucopiranososa y se evidenció la presencia de otros azúcares que no pudieron identificarse por la superposición de sus señales en la región de azúcares (3 – 5,5 ppm), adicionalmente se confirmó la presencia de ácido acético.

Los compuestos fenólicos no fueron observados en el espectro de RMN <sup>1</sup>H, por la acción de la lacasa su concentración disminuye en comparación con los blancos; finalmente, se pudo descartar la presencia de otros compuestos inhibidores de la fermentación.

Durante el proceso de fermentación se pudo determinar que la producción de etanol se da durante 6 horas, alcanzando una concentración máxima de aproximadamente 4,8 g\*L<sup>-1</sup>; adicionalmente, se determinó que la glucosa presente en el jarabe fermentable es una buena fuente de carbono para la producción de etanol por el metabolismo de *Kluyveromices marxianus*, ya que comparado con el medio Cezapek, durante las 10 horas de evaluación, la levadura logró producir más etanol y tuvo un crecimiento de biomasa menor.

## 6. Recomendaciones

Se recomienda realizar el proceso de pretratamiento e hidrólisis simultáneos en la cáscara de mazorca de cacao triturada sin tamizar, para evaluar la posibilidad de un aprovechamiento de todo el material lignocelulósico; adicionalmente se recomienda el uso de enzimas hemicelulasas, que permitan la hidrólisis de la hemicelulosa, ya que *Kluveromyces marxianus* tiene la capacidad de fermentar las pentosas que componen la hemicelulosa. Se recomienda evaluar la posibilidad de emplear agitación para el proceso de pretratamiento e hidrólisis simultáneos en los tamaños de partícula más pequeños, para lograr que todo el material lignocelulósico tenga contacto con la solución enzimática. Para el proceso de fermentación se recomienda evaluar la posibilidad de usar biorreactores que permitan completa extracción de oxígeno, para garantizar condiciones de anaerobiosis completas que potencien el metabolismo fermentativo de *Kluveromyces marxianus*.

### Referencias bibliográficas

- AIST. (s.f.). *SDBS Compounds and Spectral Search*. Descargado 2020-10-09, de <https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct{ }frame{ }top.cgi>
- Alejos C, y Calvo E. (2015). *Biocombustibles de primera generación First-generation biofuels* (Vol. 18; Inf. Téc. n.º 2).
- Altieri, M. A. (s.f.). *LOS IMPACTOS ECOLÓGICOS DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A BASE DE MONOCULTIVOS A GRAN ESCALA EN AMÉRICA* (Inf. Téc.).
- Anderson, G.-F., Pedro Nel, M.-Y., y Martha Lucía, P.-B. (s.f.). Azúcares del pseudotallo de plátano: una opción para la obtención de alcohol de segunda generación.
- Arana, A., Tellez, A., y González, T. (2002). *Aspectos generales de la biodegradación de la Madera: Aplicaciones industriales de las laccasas LIGNIN DEGRADING MICROORGANISMS: FUNGAL LACCASES-CORIOLOPSIS GALLICA View project* (Inf. Téc.). Descargado de <https://www.researchgate.net/publication/261392165>
- Área Metropolitana de Bucaramanga. (2020, mar). *Cuatro estaciones de monitoreo de material particulado PM 2.5 en el Área Metropolitana continúan en el rango Dañino a la Salud. La quinta estación, ubicada en Ciudadela Real de Minas, entró en mantenimiento - AMB*. Descargado 2020-10-09, de <http://www.amb.gov.co/cuatro-estaciones-de-monitoreo-de-material-particulado-pm-2-5-en-el-area-metropolitana-continuan-en-el-rango-danino-a-la-salud-la-quinta-estacion-ubicada-en-ciudadela-real-de-minas-entro-en-manteni/>
- Argout, X., Salse, J., Aury, J. M., Guiltinan, M. J., Droc, G., Gouzy, J., ... Lanaud, C. (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, 43(2), 101–108. doi: 10.1038/ng.736
- Arismendy, A. M., Sequeira, M. J., Felissia, F. E., Area, M. C., y Chamorro, E. (2018). Evaluación de cepas fermentativas en la hidrólisis y fermentación simultáneas (SSF) de cascarilla de

arroz para la producción de bioetanol.

- Balan, V., Da Costa Sousa, L., Chundawat, S. P., Vismeh, R., Jones, A. D., y Dale, B. E. (2008, may). Mushroom spent straw: A potential substrate for an ethanol-based biorefinery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 293–301. doi: 10.1007/s10295-007-0294-5
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., y Bashir, K. (2017, aug). *Status, supply chain and processing of cocoa - A review* (Vol. 66). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.tifs.2017.06.007
- Bernal Juárez, B. (2013). Tecnología enzimática para la sacarificación de biomásas vegetales en solventes neotéricos= Enzyme technology for plant biomass saccharification in neoteric solvents. *Proyecto de investigación:*
- BioSystems. (s.f.). *Bioquímica - BioSystems Antioquia*. Descargado 2020-10-09, de <http://www.biosystemsantioquia.com.co/productos/reactivos/112-quimica-clinica/116-bioquimica>
- Caligiani, A., Acquotti, D., Cirlini, M., y Palla, G. (2010, dec). <sup>1</sup>H NMR study of fermented cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12105–12111. doi: 10.1021/jf102985w
- Caligiani, A., Acquotti, D., Palla, G., y Bocchi, V. (2007, feb). Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 585(1), 110–119. doi: 10.1016/j.aca.2006.12.016
- Carpio, E. V., Castro, L. M., y Campo Fernández, M. (s.f.). *Caracterización físico-química de la cascarilla de Theobroma cacao L, variedades Nacional y CCN-51 Physical-chemical characterization of Theobroma cacao L husk, National varieties and CCN-51* (Vol. 2; Inf. Téc.). Descargado de <http://investigacion.utmachala.edu.ec/proceedings/index.php/utmach/index>
- Chávez-Sifontes, M., y Domine, M. E. (2013). *LIGNINA, ESTRUCTURA Y APLICACIONES: MÉTODOS DE DESPOLIMERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS ARO-*

- MÁTICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL LIGNIN, STRUCTURE AND APPLICATIONS: DE-POLYMERIZATION METHODS FOR OBTAINING AROMATIC DERIVATIVES OF INDUSTRIAL INTEREST* (Vol. 4; Inf. Téc. n.º 4). Descargado de <http://www.exeedu.com/publishing.cl/av{ }cienc{ }ing/15>
- Cuervo, L., Folch-Mallol, J. L., Estela, R., y Castañeda, Q. (s.f.). *Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol* Most recent document title: *Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperal* (Inf. Téc.). Descargado de <https://www.researchgate.net/publication/266610846>
- Eduardo, J., Salgado, J. J., y Perez, R. (2015). *Perspectivas de los biocombustibles en Colombia* (Vol. 14) (n.º 27). Universidad de Medellín. Descargado de <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci{ }arttext{ }pid=S1692-33242015000200002{ }lng=en{ }nrm=iso{ }tlng=es>
- Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R. M., y Santa María, M. D. (2013). Resonancia magnética nuclear de protón; Aplicaciones en química orgánica. *Libro disponible en [http://www.uned.es/dpto-quim-org-bio/pdf/RMN% 20Parte1. pdf](http://www.uned.es/dpto-quim-org-bio/pdf/RMN%20Parte1.pdf)*.
- FEDECACAO. (s.f.). *Nacionales*. Descargado 2020-10-09, de <https://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/nacionales>
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., y Gombert, A. K. (2008, jun). *The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential* (Vol. 79) (n.º 3). doi: 10.1007/s00253-008-1458-6
- Franco, A. G., Yépes, P. N. M., y Sánchez, H. A. V. (2009). Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. *Scientia et Technica*, 15(42), 284–289.
- García, M., Felipe, L., Quintero, M., Montoya, A., y Asociada, P. (s.f.). ANÁLISIS COMPARATIVO DE COMPETITIVIDAD DE LAS CADENAS PRODUCTIVAS DE CACAO DE COLOMBIA Y ECUADOR COMPARATIVE ANALYSIS OF PRODUCTIVE CHAIN THE

## PRODUCTION OF COCOA BETWEEN COLOMBIA AND ECUADOR.

- Giovanni Cortes Ortiz, W. (s.f.). *Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos* *Applicable to Treatment Materials for Obtaining Lignocellulosic Ethanol and Chemicals* (Inf. Téc.).
- Guo, M., Song, W., y Buhain, J. (2015). *Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective* (Vol. 42). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.rser.2014.10.013
- Hernández Hernández, A. M. (2013). *Índice de calidad del aire (ICA)*. Descargado 2020-10-09, de <http://www.ideam.gov.co/documents/11769/641368/2.01+HM+Indice+calidad+aire.pdf/5130ffb3-a1bf-4d23-a663-b4c51327cc05>
- Hsieh, R. C., Johnson, S. M., y Dudek, D. H. (1990, nov). *Apparatus for sterilization of spices and leafy herbs*. Google Patents.
- Isabel Montoya, M. R., Andrés Quintero, J. S., Julián Sánchez, O. T., y Ariel Cardona, C. A. (2005). *Evaluación económica del proceso de obtención de alcohol carburante a partir de caña de azúcar y maíz* (Vol. 41; Inf. Téc. n.º 139).
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Mohd Azhar, S. H., Marbawi, H., Gansau, J. A., y Ravindra, P. (2016, nov). *A review on third generation bioethanol feedstock* (Vol. 65). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.064
- Johannes, C., y Majcherczyk, A. (2000). *Laccase activity tests and laccase inhibitors* (Vol. 78; Inf. Téc.). Descargado de [www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)
- Johnny, O., Pineda, J., Ángel, M., García, G., Javier, ., y Alzate, F. (s.f.). *Remoción de los inhibidores de la fermentación etanólica usando membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) por pervaporación* *Removal of ethanolic fermentation inhibitors using polydimethylsiloxane (PDMS) membranes by pervaporation* (Inf. Téc.).
- Kadnikova, E. N., y Kostickostic, N. M. (2002). *Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass. Effects of glass matrix on reactivity* (Vol. 18; Inf. Téc.).

- Kiers, J., Zeeman, A.-M., Luttik, M., Thiele, C., Castrillo, J. I., Steensma, H. Y., ... Pronk, J. T. (1998). *Regulation of Alcoholic Fermentation in Batch and Chemostat Cultures of Kluyveromyces lactis CBS 2359* (Vol. 14; Inf. Téc.).
- Kirk, T. K., y Jeffries, T. W. (1996, nov). Roles for Microbial Enzymes in Pulp and Paper Processing. En (pp. 2–14). doi: 10.1021/bk-1996-0655.ch001
- Lane, M. M., y Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus: A yeast emerging from its sister's shadow* (Vol. 24) (n.º 1-2). doi: 10.1016/j.fbr.2010.01.001
- Li, L., Li, X. Z., Tang, W. Z., Zhao, J., y Qu, Y. B. (2008, nov). Screening of a fungus capable of powerful and selective delignification on wheat straw. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 415–420. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02447.x
- Lodder, J., Acomina], y Kreger-van Rij, N. J. W. (1952). *The yeasts-a taxonomic study*. Amsterdam, North-Holland Publishing Company.
- Maicas, S. (2020, aug). *The role of yeasts in fermentation processes* (Vol. 8) (n.º 8). MDPI AG. doi: 10.3390/microorganisms8081142
- MARTHA MALAGÓN, ADRIANA PÁEZ, ANDREA LACHE, J. S. Y. D. Z. (2017). mezclas de los residuos orgánicos generados en una emPresa alimentos. *25 De Abril De 2017*, 10, 47–59.
- Mendoza-Vargas, L., Jiménez-Forero, J., y Ramírez-Niño, M. (2017). Evaluación de la pectina extraída enzimáticamente a partir de las cáscaras del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(1), 131–138.
- Ojeda, K. A., Quintero, V., Rondón, S. F., y Kafarov, V. V. (2009). *Evaluación de sostenibilidad de la producción de biocombustibles de segunda generación mediante la aplicación de análisis exergético Evaluation of sustainability of the production of biofuels of the second generation by means of the application of analysi* (Vol. 7; Inf. Téc. n.º 2).
- Ortiz-Valbuena, K. L., y Álvarez-León, R. (2015). Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en

- los suelos de una finca cacaotera, Municipio de Yaguara (Huila, Colombia). *Boletín Científico Centro De Museos De Historia Natural*, 19, 65+.
- Oyetuji, S. (2015). *Optimization of Bioethanol production from Cocoa (Theobroma cacao) Bean Shell* (Vol. 4; Inf. Téc. n.º 4). Descargado de <http://www.ijcmas.com>
- Padín González, C., y Díaz Fernández, M. (2009). Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 110–116.
- Peralta, R. M., da Silva, B. P., Gomes Côrrea, R. C., Kato, C. G., Vicente Seixas, F. A., y Bracht, A. (2017). Chapter 5 - Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. En G. Brahmachari (Ed.), *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 119–149). Academic Press. Descargado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128037256000054> doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>
- Pinheiro, R., Belo, I., y Mota, M. (2002). Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(6), 842–847. doi: 10.1007/s00253-001-0927-y
- Quezada, J. P. S., Herrero, J. S., y Herguido, J. (2018). Hidrólisis ácida de cáscaras de vaina de cacao CCN-51. *Jornada de Jóvenes Investigadores del ISA*, 6.
- Ramón, A. P., Taschetto, L., Lunelli, F., Mezdari, E. T., Souza, M., Foletto, E. L., . . . Mazutti, M. A. (2015). Ultrasound-assisted acid and enzymatic hydrolysis of yam (*Dioscorea* sp.) for the production of fermentable sugars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 98–102. doi: 10.1016/j.bcab.2014.11.001
- Sáez-Plaza, P., Martín, J., y Asuero, A. G. (2017). Dichromate oxidation of ethanol and phenol bromination: a tale of two reactions. *An Real Acad Nac Farm*, 83(3), 313–320.
- Segura-Contreras, J. F., y Franco, J. F. (2016, mar). Exposición de peatones a la contaminación del aire en vías con alto tráfico vehicular. *Revista de Salud Pública*, 18(2), 179–187. doi: 10.15446/rsap.v18n2.47209

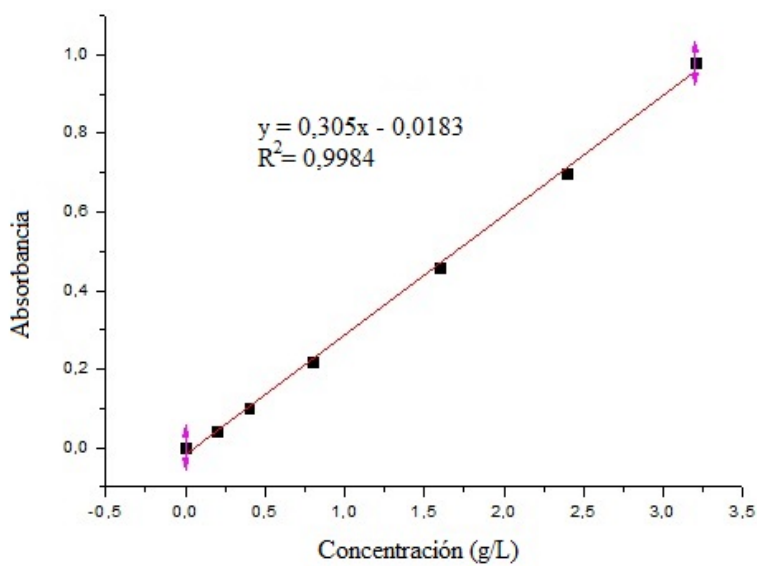
- Seo, H. B., Kim, H. J., Lee, O. K., Ha, J. H., Lee, H. Y., y Jung, K. H. (2009, feb). Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 285–292. doi: 10.1007/s10295-008-0497-4
- Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152–178.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., y Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
- Tejeda, L. P., Tejeda, C., Villabona, Á., Alvear, M. R., Castillo, C. R., Henao, D. L., . . . Tarón, A. (s.f.). PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE JARABES GLUCOSADOS DERIVADOS DE CÁSCARAS DE NARANJA Y PIÑA. Descargado de [www.acofi.edu.co](http://www.acofi.edu.co)
- Tena, M., y Jorrián, J. (2010). Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. *Bioquímica y Biología Molecular*, 32(1), 1–14.
- Vásquez-Barajas, E. F., García-Torres, N. E., Bastos-Osorio, L. M., y Lázaro-Pacheco, J. M. (2018, jun). Análisis económico del sector cacaoero en Norte de Santander, Colombia y a nivel internacional. *REVISTA DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN*, 8(2), 237. doi: 10.19053/20278306.v8.n2.2018.7963
- Viñals-Verde, M., Bell-García, A., Michelena-Álvarez, G., y Ramil-Mesa, M. (2012). Ethanol production from lignocellulosic biomass. *ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46(1), 7–16.
- Xu, X., Lin, M., Zang, Q., y Shi, S. (2018). Solid state bioconversion of lignocellulosic residues by *Inonotus obliquus* for production of cellulolytic enzymes and saccharification. *Bioresource Technology*, 247, 88–95. doi: 10.1016/j.biortech.2017.08.192
- Youn, H.-D., Hah, Y. C., y Kang, S.-O. (2006, jan). Role of laccase in lignin degradation by

white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 132(3), 183–188. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07831.x

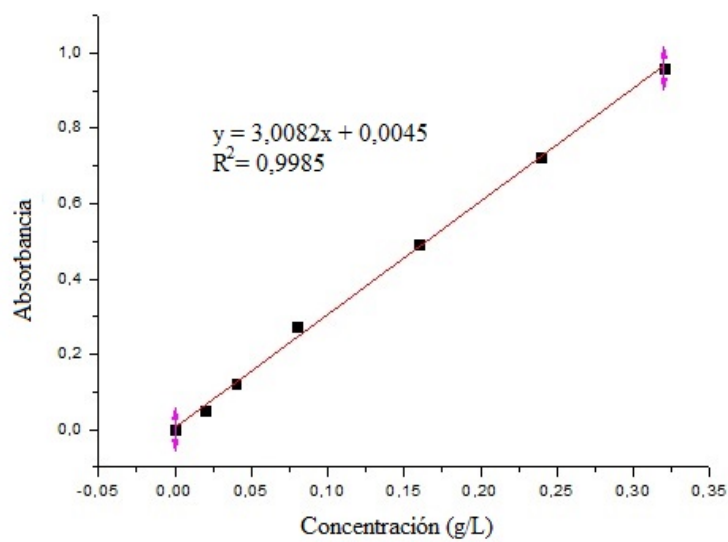
Zhang, X., Xu, C., y Wang, H. (2007, aug). Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(2), 149–151. doi: 10.1263/jbb.104.149

**Apéndice**

**Apéndice A.** *Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores*



**Apéndice B.** *Curva de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos*



**Apéndice C.** *Curva de calibración para la cuantificación de etanol*

